Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 133- 142

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۱۴۲-۱۳۳

مقاله علمی- پژوهشی

تولید بستنی مبتنی بر تخم‌مرغ فراسودمند حاوی ایمونوگلوبین Y بر علیه باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*

سحر صباحی[۱]- علی مرتضوی*[۲]- محمدرضا نصیری[۳]- آرش قزوینی[۴]- فخری شهیدی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۴

چکیده

امروزه، مصرف‌کنندگان به دنبال غذاهای هستند که باعث سلامتی شده و خطر ابتلا به بیماری‌ها را کاهش دهد. تخم‌مرغ به‌عنوان منبع بزرگی از ایمونوگلوبین Y است که نقش بسیار مهمی در ایمنی غیرفعال دارد. از این رو، این پژوهش با هدف ایجاد ایمنی غیرفعال خوراکی در برابر باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* که شیوع بسیار وسیعی در جهان داشته و عامل اصلی زخم و سرطان معده است، صورت پذیرفت. بدین منظور، سلول‌های باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از فرمالدهید غیرفعال و پس از ترکیب با ادجوانت فعال و غیرفعال فروند به ۴ نقطه از سینه مرغ نژاد لگهورن سفید تزریق زیرجلدی شد. استخراج آنتی بادی IgY با استفاده از پلی‌اتیلین گلایکول و کیفیت و غلظت آن با استفاده از روش های SDS-PAGE و برادفورد مورد بررسی قرار گرفت. از زرده تخم‌مرغ‌های حاوی IgY به‌منظور تولید بستنی تخم‌مرغی استفاده و محصول در مقایسه با بستنی وانیلی مورد ارزیابی حسی قرار گرفت. از تست الایزا غیرمستقیم به‌منظور بررسی فعالیت IgY استخراجی، همچنین فعالیت IgY در طی سه ماه پس از تولید استفاده شد. حضور دو باند ۲۵ و ۶۷ کیلودالتونی بر روی ژل نشان از کیفیت مناسب روش استخراج داشت و غلظت IgY استخراجی ۱۱/۴۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. آنالیز فعالیت IgY با روش الایزا نشان داد که بیشترین میزان این آنتی‌بادی در هفته دوم داشته و بعد از ۳ ماه نگهداری بستنی تخم‌مرغی در دمای ۱۸-، ۹۴ درصد از فعالیت آنتی‌بادی حفظ شده است. بررسی ارزیابی حسی بین بستنی حاوی IgY و نمونه شاهد نشان دهنده عدم تفاوت معنی داردر ۵ پارامتر اصلی تست چند نقطه ای می باشد. بنابراین، با توجه به فعال بودن آنتی‌بادی IgY در آزمایش‌های الایزا، امکان اتصال IgY حاضر در بستنی تخم‌مرغی تولید شده در این پژوهش با باکتری *هلیکوباکتری پیلوری* فراهم بوده و این محصول می‌تواند در پیشگیری از تکثیر باکتری *هلیکوباکتری پیلوری* موثر عمل کند.

واژه‌های کلیدی: ایمونوگلوبین Y، بستنی، ایمنی‌زایی غیرفعال، *هلیکوباکترپیلوری*.

مقدمه

تخم‌مرغ یکی از مواد غذایی بسیار مغذی است که در بقاء و رشد انسان، نقش بسیار حیاتی دارد. تخم‌مرغ منبع اصلی مواد مغذی مانند پروتئین‌ها، چربی، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، کلسترول، کولین، فولات، آهن، کلسیم، فسفر، سلنیوم، روی و ویتامین‌های A، B2، B6، B12، D، E و K است (Réhault-Godbert *et al.*, 2019). تخم‌مرغ همچنین منبع بسیار مناسبی از کارتونوئیدهای آنتی اکسیدانی[۵]، لوتین[۶] و زاکزانتین[۷] است (Abdel-Aal *et al.*, 2013). لذا، با توجه به خواص تغذیه‌ایی بسیار مناسب، این ماده غذایی به‌عنوان یکی از کاندیدهای اصلی جامعه، جهت تامین نیاز به مواد مغذی در نظر گرفته می شود.

در سال ۱۸۹۳، ایده انتقال ایمنی غیرفعال آنتی‌بادی‌های اختصاصی از مرغ به جوجه از طریق تخم‌مرغ، توسط Klemperer گزارش شد (Rahman *et al.*, 2013). بعد از آن، در سال ۱۹۶۹ دانشمندان اصطلاح IgY را برای آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ ارائه کردند (Leslie and Clem, 1969). IgY، آنتی بادی سرمی اصلی دوزیستان، خزندگان و پرندگان بوده و دارای مشترکاتی با آنتی‌بادی‌های IgG و IgE پستاندارن است (Taylor *et al.*, 2008). IgY گیلکوپروتئینی است که اولین بار به‌عنوان یک گاماگلوبولین شناخته شده و به‌طور متوسط ۱۰-۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زرده

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۴- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: morteza@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i5.83058

5 Antioxidant Carotenoid
6 Lutein
7 Zeaxanthin

تخم‌مرغ و ۵-۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در خون تولید می‌شود. دومین[1] اصلی این آنتی‌بادی برخلاف آنتی‌بادی‌های پستاندارن فاقد منطقه لولا[2] است، بنابراین انعطاف‌پذیری کمتری جهت اتصال به اپی‌توپ-های آنتی‌ژنی دارد. با این حال، بررسی‌ها نشان می‌دهد که IgY تمایل ۳ تا ۵ برابری و همچنین سرعت بالاتری جهت اتصال به یک آنتی ژن در مقایسه با IgG دارد (Ikemori *et al*., 1993; Lemamy *et al*., 1999; Rahman *et al*., 2013). پژوهشگران با استفاده از ایده انتقال ایمنی غیرفعال در مرغ، تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی برعلیه گونه‌های مختلف باکتریایی و ویروسی را با هدف کاربرد در علوم پزشکی و تحقیقات ایمونولوژیک بهینه‌سازی نمودند (Xu *et al*., 2011, Nassiri *et al*., 2015; Narat *et al*., 2003).

مقدار بسیار ناچیزی از آنتی‌ژن (در محدوده میلی‌گرم یا میکروگرم) معمولا می‌تواند پاسخ کافی از IgY را در بدن مرغ به همراه داشته باشد و تیتر آنتی‌بادی در طی چند هفته و چند ماه باقی بماند (Rahman *et al*., 2013). از این رو، استفاده از IgY به‌عنوان ایمنی درمانی دارای چندین خصیصه جذاب است. مهمترین این ویژگی‌ها عدم واکنش با سیستم ایمنی بدن انسان است و گیرنده‌های FC انسان مانع التهاب‌های غیراختصاصی می‌شود (Larsson *et al*., 1993)، به‌منظور استخراج IgY نیازی به استفاده از ترکیبات سمی و یا مواد افزودنی نیست، امکان کنترل کلسترول و تری‌گلسیرید تخم‌مرغ در سطوح بسیار ناچیز وجود دارد (Nilsson *et al*., 2008)، آنتی‌بادی IgY به همراه پروتئین‌های دیگر دارای اثر آنتی میکروبی و تحریک‌کننده ایمنی هستند (Kovacs-Nolan *et al*., 2005). آلرژی به تخم‌مرغ به دلیل اجزای آلبومین سفیده تخم‌مرغ است که سبب پاسخ‌های ایمنی می‌گردد، لذا، به‌منظور تامین نیاز این مصرف‌کنندگان، IgY خالص شده در بازار ارائه می‌گردد. در مقایسه با واکسیناسیون، ایمونودرمانی غیرفعال دارای مزایایی از قبیل شروع سریع و موضعی، قابلیت استفاده در دامنه وسیع تر سنی (کودک و بزرگسال)، فعالیت اختصاصی بالا و سمی نبودن برای مصرف در جیره انسان می‌باشد. آنتی‌بادی IgY در دامنه دمایی ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۳/۵ تا ۱۱ فعال بوده و در برابر تریپسین و کیموتریپسین کاملا مقاوم است (Rahman *et al*., 2013).

باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* یکی از عوامل اصلی گاستریت مزمن فعال و سرطان بدخیم معده است و به‌عنوان فاکتور کلیدی تشدید زخم معده شناخته می شود (Backert *et al*., 2016). این باکتری با تحریک مداوم ترشحات معده، زخم‌ها را تشدید می‌کند (Czinn & Blanchard, 2011; Kabir, 2007; Sutton &Lee, 2011). گزارش‌ها نشان می‌دهند که میزان شیوع *هلیکوباکتر پیلوری* در بین کودکان ۱/۸ تا ۶۵ درصد و در بعضی کشورها در بین بزرگسالان این باکتری تا ۹۰ درصد شیوع دارد (Aitila *et al*., 2019). بنابراین، از بین بردن *هلیکوباکترپیلوری* نکته اصلی درمان زخم معده در بزرگسالان است (Yong *et al*., 2015). در بین درمان‌های جدید، استفاده از منابع طبیعی مانند پروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی، ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ به‌عنوان موثرترین، قوی‌ترین و ارزان‌ترین دارو شناخته می‌شود (Mony *et al*., 2019; Hong *et al*., 2018).

ایمنی درمانی دهانی[3] یکی از مسیرهای جذاب استفاده از IgY در درمان بیماری‌های عفونی انسان است، زیرا دهان محل ورودی بسیاری از عوامل عفونی است (Russo *et al*., 2001). قابلیت جذب IgY از سلول‌های روده وجود ندارد، لذا، این آنتی بادی سبب واکنش‌های سیستامتیک نمی‌گردد. بنابراین خطر واکنش‌های آلرژیک زمانی که IgY به شکل خوراکی مصرف می‌شود، وجود نخواهد داشت (Matsunaga *et al*., 2000). علاوه بر این، تجویز خوراکی تخم مرغ به‌منظور افزایش تحمل سیتمیک صورت می‌پذیرد (Rahman *et al*., 2013). این بدان معنی است، که مصرف روزانه IgY بدون هیچ گونه خطر برای سلامت انسان سبب کنترل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می شود. در حال حاضر، چندین اختراع و مطالعه در خصوص تولید فرآورده‌های حاوی IgY انجام شده، که نتایج آن تجاری نشده است (Yamane *et al*., 2003; Horie *et al*., 2004; Chen *et al*., 2003). در این مطالعات از ماست به‌عنوان حامل IgY استفاده کردند که با توجه به حضور نمک کلروسدیم و همچنین سایر ترکیبات این ماده غذایی، پایداری آنتی‌بادی کاهش یافته است. پژوهش‌ها نشان داده که بستنی با توجه به مزایایی همچون دمای نگهداری ۲۰- ، حضور کربوهیدرات‌ها (سبب افزایش ماندگاری آنتی‌بادی می‌شود) (Aradat *et al*., 2000, Lee *et al*., 2003)، مشتری‌پسند بودن و امکان استفاده مستقیم تخم‌مرغ در آن، گزینه بسیار مناسب‌تر جهت تولید یک ماده غذایی حاوی IgY است.

هدف از انجام این پژوهش، تولید بستنی تخم‌مرغی حاوی آنتی‌بادی IgY بر علیه باکتری *هلیکوباکترپیلوری* برای اولین بار می‌باشد. همچنین ارزیابی حسی با استفاده از آزمون استاندارد چندنقطه‌ای صورت پذیرفت. استفاده روزانه از این بستنی می‌تواند جمعیت میکروبی *هلیکوباکتری پیلوری* را کنترل و از به‌روز بیماری‌های زخم معده و سرطان معده جلوگیری نماید.

1 Domain
2 Hinge
3 Oral Immunotherapy

مواد و روش‌ها

پرورش مرغ‌ها

۶ مرغ سفید نژاد لگهورن در هفته سیزدهم از مرکز تحقیقات علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این مرغ‌ها تحت شرایط محیطی ۱۸ ساعت نور و ۶ ساعت خاموشی و با دسترسی به جیره آزاد پرورش داده شدند (Nasiri *et al*., 2016).

آماده‌سازی آنتی‌ژن

باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* از آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان قائم مشهد تهیه و به‌منظور رشد آن از محیط کشت مایع Mueller-Hinton استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس کدورت با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در OD 550 و با استفاده از روش Blanchard و همکاران (۲۰۱۲) صورت پذیرفت. سپس ۱۰^۹ کلنی از باکتری‌های *هلیکوباکترپیلوری* با استفاده از ۵ میلی‌لیتر بافر کلروسدیم ۸۵ درصد شستشو (۳ بار) و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. به‌منظور غیرفعال کردن باکتری، پلت‌ها در ۰/۳ درصد از فرمالدهید سوسپانسیون و سپس ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ و سپس پلت‌های باکتری در ۵ میلی‌لیتر کلروسدیم ۸۵ درصد محلول و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Loibner *et al*., 2016).

ایمنی‌زایی در مرغ

دو گروه از مرغ‌ها (هر گروه ۳ تکرار) به‌عنوان گروه‌های کنترل و تیمار در نظر گرفته شدند. در ۱۶ هفتگی اولین ایمنی‌زایی با استفاده از حجم مشابه از آنتی‌ژن و ادجوانت کامل فروند با تزریق به ۴ محل از سینه مرغ (هر محل ۲۵۰ میکرولیتر) صورت پذیرفت. از ادجوانت کامل فروند بدون اضافه کردن آنتی ژن جهت تزریق نمونه‌های کنترل استفاده شد. تزریق مرحله دوم، در ۱۸ هفتگی و با استفاده از ادجوانت ناقص فروند صورت پذیرفت. تزریق سوم در ۲۰ هفتگی و با استفاده از ادجوانت کامل فروند انجام شد. یک هفته بعد از اولین تزریق، نمونه‌های تخم‌مرغ به شکل روزانه جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Pauly *et al*., 2011).

خالص‌سازی IgY

جداسازی و خالص‌سازی IgY با استفاده از روش پلی‌اتیلین گلایکول (PEG600) (مرک، آلمان) صورت پذیرفت (Pauly *et al*., 2011). به‌طور خلاصه، زرده تخم‌مرغ از سفیده جدا شد و پس از حذف غشائی زرده، محتویات زرده در بافر سالین فسفات (pH=7.6) به اندازه دو برابر حجم زرده ریخته و سپس با استفاده از ورتکس همزده شد. سپس ۳/۵ درصد وزنی-حجمی از PEG به این محلول اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط بر روی شیکر قرار داده شد و سپس در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. به‌منظور حذف چربی‌ها، محلول رویی بر روی کاغذ واتمن ریخته شده و سپس فیلتر شد. پس از آن PEG با غلظت حجمی وزنی ۸ درصد به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط بر روی شیکر قرار گرفت. سپس محلول به مدت ۲۰ دقیقه مطابق مرحله قبل سانتریفوژ شد. پلت تشکیل شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات حل و سپس ۱۲ درصد وزنی حجمی PEG به آن اضافه و مطابق مراحل قبل سانتریفوژ گردید. پلت تشکیل شده در ۲ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات حل و در بافر سالین فسفات به مدت ۱۶ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز گردید. IgY تولیدی با استفاده از SDS-PAGE و روش برادفورد مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش الایزا به‌منظور شناسایی فعالیت اختصاصی آنتی‌بادی

به‌منظور برآورد فعالیت اختصاصی آنتی‌بادی خالص شده بر با کتری *هلیکوباکتر پیلوری* از روش الایزا استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف باکتری *هلیکوباکترپیلوری* ($۱۰^{۳}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$CFU) درکف پلیت الایزا کوت شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس پلیت ۳ بار با محلول سالین فسفات حاوی ۰/۰۵ درصد Tween20 شستشو و ۱/۵ درصد بافر بلوکه‌کننده ۱/۵ درصد BSA به آن اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادیIgY تولیدی بر روی آنتی‌ژن ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. نمونه‌ها با استفاده از محلول سالین بافر شستشو و سپس آنتی‌بادی ثانویه rabbit anti-chicken IgY H&L (HRP) با غلظت ۱ به ۱۰۰۰۰ و با شماره کاتولوگ C2288 (سیگما، امریکا) در پلیت ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. به‌منظور شناسایی براساس رنگ، از O-phenylenediamine مطابق دستور سازنده (Sigma, USA) استفاده شد. سرانجام با استفاده از ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال، واکنش متوقف و جذب آن در ۴۹۲ نانومتر خوانش شد (Nasiri *et al*., 2016).

آماده‌سازی بستنی تخم‌مرغی

آماده‌سازی بستنی تخم‌مرغی مطابق پژوهش Herald و همکاران (۲۰۰۸) صورت پذیرفت. زرده تخم‌مرغ حاوی IgY به‌منظور تولید بستنی تخم‌مرغی و به‌منظور کنترل بستنی وانیلی تولید گردید.

بدین منظور، ۱/۴۶ گرم زرده تخم‌مرغ، ۰/۲۰ گرم پایدارکننده، ۱/۳۶ گرم شیر بدون چربی، ۶/۰۵ شکر، ۲۳/۵۲ گرم شیر پاستوریزه و ۹/۰۷ گرم خامه با هم ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد همزده شد. سوسپانسیون تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد سرد و در psi ۱۵۰۰ هموژن گردید. سوسپانسیون هموژن در ۴ درجه سانتی‌گراد به سرعت سرد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت سوسپانسیون نهایی به دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید تا بستنی آماده گردد.

بررسی مدت ماندگاری IgY در بستنی

بررسی فعالیت IgY در بستنی با استفاده از روش الایزا ۳ ماه پس از تولید صورت پذیرفت. بدین منظور، ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر بافر کربنات (pH=10) ترکیب و سپس با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ و از محلول بالایی به‌منظور برآورد ماندگاری فعالیت IgY در بستنی استفاده گردید (Horie *et al*., 2004).

ارزیابی حسی بستنی

ارزیابی حسی بستنی تخم‌مرغی از طریق نظرسنجی میزان پذیرش مصرف‌کنندگان برآورد شد. بعد از دو هفته نگهداری بستنی، نمونه‌ها براساس طعم، رنگ، احساس، بافت و پذیرش نهایی با استفاده از مقیاس ۵ درجه‌ای هدونیک مورد ارزیابی قرار گرفتند (Lima *et al*., 2016).

نتایج و بحث

تولید IgY

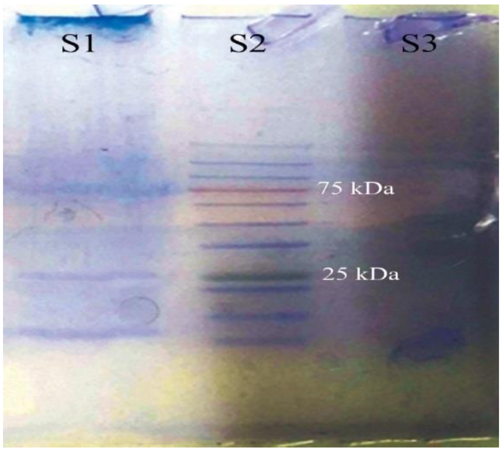
به‌منظور بررسی کیفیت IgY خالص شده، IgY استخراج شده بر روی ژل SDS-PAGE برده شد. حضور ۲ باند قوی ۲۷ و ۶۵ کیلودالتونی بر روی ژل ۱۲ درصد، نشان‌دهنده بهینه بودن شرایط استخراج آنتی‌بادی IgY و صحت انجام کار است (شکل ۱ الف). غلظت آنتی بادی استخراجی با استفاده از روش برادفورد، ۱۱/۴۶ میلی گرم بر میلی لیتر برآورد گردید (شکل ۱ ب). بررسی ها نشان می دهد که خلوص و غلظت آنتی‌بادی IgY دو فاکتور بسیار کلیدی برای استفاده از آن در فرآورده‌های غذایی است (Amro *et al*, 2018). از این رو، بهینه‌سازی روشی مناسب، در این خصوص بسیار حائز اهمیت است. تا به امروز ۲ روش اصلی برای استخراج IgY بر مبنای دو ماده پلی‌اتیلن گلایکول و تریتون[1] صورت گرفته است (Stålberg *et al*., 2001; Pauly *et al*., 2011). با این‌حال اگرچه که غلظت آنتی‌بادی استخراجی با استفاده از تریتون تا ۹۷ درصد حجم کل گزارش شده است (Stålberg *et al*., 2001)، اما این ماده به شدت برای بدن سمی بوده و استفاده از ان فرآیندهای بعدی مربوط به حذف این ماده شیمیایی را اضافه می‌کند که به نوبه خود سبب سختی کار می‌گردد. پلی‌اتیلن گلایکول ماده خوراکی برای انسان است که به‌عنوان اصلی‌ترین ماده به‌منظور خالص‌سازی IgY در پژوهش‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Najdi *et al*., 2016; Nassiri *et al*., 2016; Rahman *et al*., 2013). با این‌حال، به‌نظر می‌رسد استفاده از روش استخراج IgY به میزان بالای با هدف مطالعه وابستگی دارد. زیرا، در مطالعات تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgY به‌منظور شناسایی یک آنتی‌ژن در طراحی کیت‌های الایزا، استفاده از روش تریتون توصیه می‌گردد (Cai *et al*., 2012; Liu *et al*., 2013). یکی از اهداف اصلی این مطالعه، حذف مرحله استخراج آنتی‌بادی و اضافه کردن مستقیم زرده تخم‌مرغ به محصول جهت استفاده حداکثری از غلظت آنتی‌بادی تولیدی می‌برد.

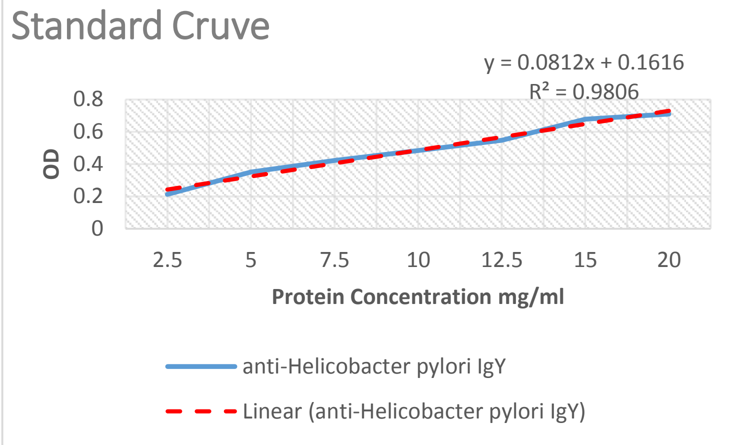
بررسی فعالیت IgY

بررسی نتایج الایزا نشان می‌دهد که انتی‌بادی IgY خالص شده می‌تواند با تمایل بالا به باکتری *هلیکوباکتری پیلوری* متصل گردد کند (شکل ۲ الف). همچنین آنالیز نتایج الایزا مشخص می‌کند که اختصاصی بودن بسیار بالا جهت اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن وجود داشته و تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار و کنترل به‌دست آمد (P-value <0.001). تعیین دز دقیق باکتری به‌منظور ایمنی‌زایی مرغ، نقش بسیار حیاتی در میزان تولید و فعالیت IgY بر علیه آنتی‌ژن‌ها دارد (Müller *et al*., 2015). از طرفی استفاده ادجوانت کامل و ناقص فروند به‌عنوان بهترین ادجوانت برای پرندگان، می‌تواند نقش به‌سزایی در تولید و فعالیت IgY داشته باشد (Schade *et al*., 2005). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با پژوهش‌های ذکر شده، مطابقت دارد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین اتصال انتی‌بادی IgY خالص‌سازی شده از مرغ‌ها بر علیه باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در هفته دوم بعد از آخرین مرحله ایمنی‌زایی ایجاد می‌شود. تولید میزان IgY با دور شدن از زمان تزریق کاهش می‌یابد (شکل ۲ ب). بررسی گزارش‌ها نشان می‌دهد که در هفته دوم تا چهارم بعد از تزریق، بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی IgY به‌دست می‌آید (Loibner *et al*., 2016; Nasiri *et al*., 2016). با این حال، باید توجه داشت که تولید IgY می‌تواند برای ۲ ماه در حیوان پایدار شود، اگر شرایط ایمنی‌زایی مانند دز ایمنی‌زایی، استفاده از ادجوانت مناسب و تزریق یادآور ایمنی‌زایی صورت پذیرد. آنالیز نتایج ماندگاری IgY در بستنی نشان می‌دهد که فعالیت IgY بعد از ۹۰ روز تنها ۶ درصد کاهش داشته است (شکل ۲ج). گزارش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت

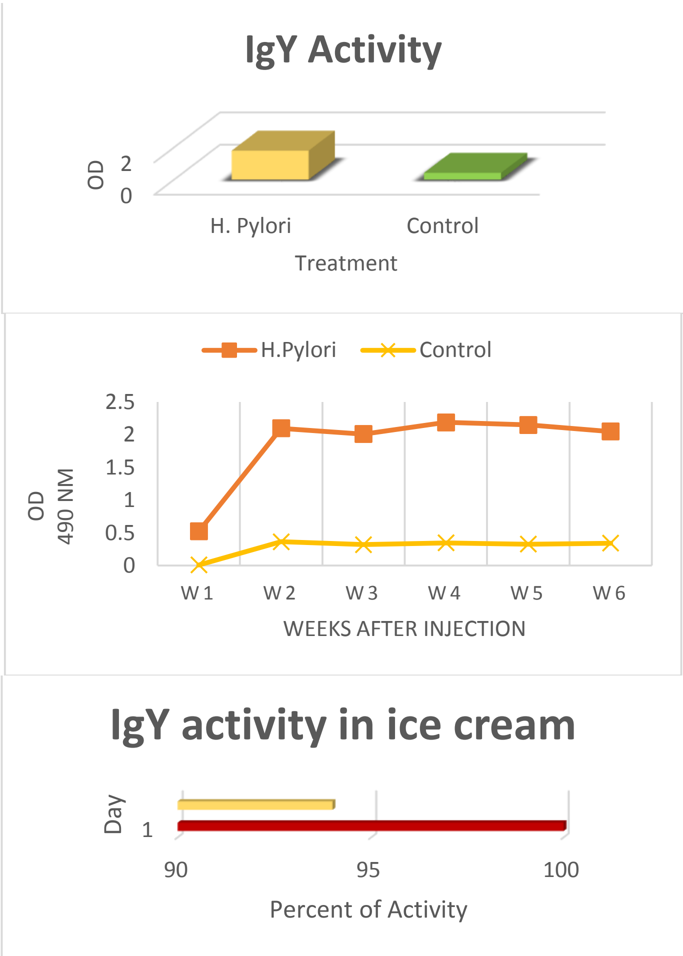
1 Triton

IgY در ماست پس از ۳ هفته ۱۵ درصد کاهش می‌یابد (Horie *et al.*, 2004).





شکل ۱- الف) بررسی آنتی بادی IgY خالص شده بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. S1: آنتی بادی IgY خالص شده از تخم‌مرغ‌های ایمنی‌زایی شده با *هلیکو باکتر پیلوری*، S2: مارکر پروتئینی شرکت سیناژن، S3: کنترل منفی ب) منحنی استاندارد تعیین غلظت پروتئین IgY. همانطور که در شکل نمایش داده شده ضریب صحت ۹۸ درصد نشان از دقت محاسبه غلظت پروتئین دارد.



شکل ۲- بررسی نتایج به‌دست آمده از آزمون الایزا. الف) نتایج فعالیت آنتی‌بادی IgY بر علیه باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*. ب) میزان فعالیت IgY در هفته بعد از ایمنی‌زایی در مرغ، ج) بررسی فعالیت IgY بعد از ۹۰ روز در بستنی.

Mensink و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که شکر می‌تواند نقش بسیار مهمی در حفاظت از پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها در مواد غذایی داشته باشد. لذا، بستنی می‌تواند محصولی مناسب‌تر به‌عنوان میزبان پروتئین‌های درمانی باشد. از طرفی در دمای نگهداری ماست در ۴ درجه سانتی‌گراد است که در این دما پروتئین تجزیه می‌شود، اما بستنی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود، که این به نوبه خود ماندگاری آنتی‌بادی در محصول را افزایش می‌دهد. مهمتر از همه ترکیبات موجود در زرده تخم‌مرغ خود دارای نقش محافظتی برای آنتی‌بادی IgY هستند، از این رو عدم استخراج IgY و استفاده مستقیم از زرده تخم‌مرغ آن می‌تواند به افزایش ماندگاری IgY در محصول منجر گردد.

آنالیز ارزیابی حسی بستنی

آنالیز نتایج به‌دست آمده از ارزیابی حسی (تست هدونیک) برای مقایسه دو بستنی تخم‌مرغی حاوی IgY و بستنی وانیلی نشان می‌دهد که این بستنی قابلیت تجاری شدن را داشته و هیچ تفاوت معنی‌داری بین ویژگی‌های مورد بررسی آن با نمونه کنترل وجود ندارد (جدول ۱). در بستنی‌های سنتی از زرده تخم‌مرغ به‌عنوان پایدارکننده استفاده می‌شود، در فرمولاسیون‌های مدرن به دلیل کاهش هزینه مواد دیگر جایگزین تخم‌مرغ شده است (Barford, 2001). در مطالعه‌ای پژوهشگران بستنی وانیلی و تخم‌مرغی را از نظر ویژگی‌های بافتی (آنالیز بافت، دمای ذوب، ویسکوزیته و ...) و ارزیابی حسی مقایسه کردند (Herald *et al*., 2008). نتایج آنها نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین بستنی‌های وانیلی و تخم‌مرغی از نظر پارامترهای بافتی و ارزیابی حسی وجود ندارد. لذا، ایده تولید ماده غذایی که باعث سلامتی بدن انسان شده و خطر ابتلا به بیماری را کاهش استقبال مصرف‌کنندگان را به دنبال خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

بستنی یکی از فرآورده‌های مشتری‌پسند و ارزان است که به سبب ویژگی‌های همچون نگهداری در دمای ۱۸- و استفاده از شکر می‌تواند به‌عنوان بهترین کاندید انتقال پروتئین‌های درمانی به بدن انسان باشد. در این مطالعه با اضافه کردن زرده تخم‌مرغ به بستنی، فرآورده غذایی جدیدی با ویژگی‌های درمانی برای انسان بر علیه باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* تولید شد. آنتی‌بادی IgY بعد از ۱۲ هفته همچنان به شکل فعال در بستنی حضور داشت و مقایسه ارزیابی حسی این بستنی با بستنی وانیلی تاییدکننده بازارپسندی بستنی تخم‌مرغی می‌باشد. از این‌رو، مهمترین هدف این مطالعه که تولید بستنی فراسودمند به‌منظور پیشگیری و درمان زخم و سرطان معده در افراد درگیر با باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* است، به‌دست آمد.

تشکر و قدردانی

این پروژه تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۴۶۷۵۱ صورت پذیرفته، که بدین وسیله از این معاونت محترم قدردانی می شود.

جدول ۱- نتایج ارزیابی حسی برای ۵ پارامتر اصلی تست هدونیک بستنی‌های وانیلی و تخم‌مرغی.

فرمول	بافت	احساس	مزه	طعم	رنگ	پذیرش کلی
تخم‌مرغی	۳/۵۶±۰/۲۰۳	۳/۷۵±۰/۲۸۲	۳/۴۳±۰/۲۸۶	۳/۲۵±۰/۲۵۱	۳/۳۱±۰/۲۷۸	۳/۶۲±۰/۲۱
وانیلی	۳/۵۰±۰/۲۰۳	۳/۶۸±۰/۲۸۲	۳/۳۱۲±۰/۲۸۶	۳/۶۸±۰/۲۵۱	۳/۶۲±۰/۲۷۸	۳/۶۸±۰/۲۱

منابع

Abdel-Aal, el-S. M., Akhtar, H., Zaheer, K. & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 9;5(4):1169-85.

Aitila, P., Mutyaba, M., Okeny, S., Ndawula, K. M., Kasule, R., Ssedyabane, F., Okongo, B., Onyuthi Apecu, R., Muwanguzi, E. & Oyet, C. (2019). Prevalence and Risk Factors of Helicobacter pylori Infection among Children Aged 1 to 15 Years at Holy Innocents Children's Hospital, Mbarara, South Western Uganda. *Journal of Tropical Medicine*, 7: 930-942.

Amroa, W.A., Qaisib, W. A. & Razema, F. A. (2017). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16, 99-103.

Backert, S., Neddermann, M., Maubach, G., & Naumann, M. (2016). Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter, 21, 19–25.

Blanchard, T. G., & Nedrud, J. G. (2006). Laboratory maintenance of helicobacter species. Current protocols in microbiology, Chapter 8, Unit8B.1.

Cai, Y. C., Guo, J., Chen, S. H., Tian, L. G., Steinmann, P., Chen, M. X., Li, H., Ai, L. & Chen, J. X. (2012). Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of Schistosoma japonicum. *International Journal for Parasitology*, 61(3), 385-90.

Chen, J.P. & Chang, M.C. (2003) Effect of Anti-Helicobacter pylori Urease Antibody (IgY) as a Food Ingredient on the Decrease of H. pylori in the Stomach of Humans Infected with H. pylori. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science*, 41, 408-414.

Czinn, S. J., & Blanchard, T. (2011). Vaccinating against Helicobacter pylori infection. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8, 133–140.

Hong, K. S., Ki, M. R., Ullah, H. M. A., Lee, E. J., Kim, Y. D., Chung, M. J., Jeong, K. S. (2018). Preventive effect of anti-VacA egg yolk immunoglobulin (IgY) on Helicobacter pylori-infected mice. *Vaccine*, 36(3), 371–380.

Horie, K., Horie, N., Abdou, A.M., Yang, J.O., Yun, S.S., Chun, H.N., Park, C.K., Kim, M. and Hatta, H. (2004). Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. *Journal of Dairy Science*, 87, 4073-4079.

Ikemori, Y., Peralta, R. C., Kuroki, M., Yokoyama, H. & Kodama, Y. (1993). Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic Escherichia coli fimbriae. *Poultry Science*, 72, 2361 – 23655.

Jaradat, Z.W. & Marquardt, R. R. (2000). Studies on the Stability of Chicken IgY in Different Sugars, Complex Carbohydrates and Food Materials. *Food and Agricultural Immunology*. 12, 263–272.

Kabir, S. (2007). The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: A review. *Helicobacter*, 12, 89–102.

Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8421 - 31;

Larsson, A., Bålöw, R. M., Lindahl, T. L. & Forsberg, P. O. (1993). Chicken antibodies: taking advantage of evolution. *Poultry Science*, 72, 1807 – 1802.

Lemamy, G. J., Roger, P., Mani, J. C., Robert, M., Rochefort, H. & Brouillet, J. P. (1999). High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *International Journal of Cancer*, 80, 896 – 902.

Leslie, G. A. & Clem, L. W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. *Journal of Experimental Medicine*, 130,1337-1345.

Liu, L. N., Jing, F.J., Cui, J., Fu, G. Y. & Wang, Z. Q. (2013). Detection of circulating antigen in serum of mice infected with Trichinella spiralis by an IgY-IgM mAb sandwich ELISA. *Experimental Parasitology*.133(2):150-5.

Loibner, M., Buzina, W. & Viertler, C. (2016). Pathogen Inactivating Properties and Increased Sensitivity in Molecular Diagnostics by PAXgene, a Novel Non-Crosslinking Tissue Fixative. *PLoS One*, 11:1-233 15.

Matsunaga, Y., Wakatsuki, Y., Tabata, Y., Kawasaki, H., Usui, T., Yoshida, M. (2000). Oral immunization with size-purified microsphere beads as a vehicle selectively induces systemic tolerance and sensitization. *Vaccine*, 19:579 – 88.

Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K. & Hinrichs, W. L. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114:288-295.

Mony, T. J., Kwon, H. S., Won, M. K., Kang, Y. M., Lee, S. H., Kim, S. Y., Bae, D. Y.& Elahi, F. (2019). Anti-urease immunoglobulin (IgY) from egg yolk prevents Helicobacter pylori infection in a mouse model. *Food and Agricultural Immunology*, 30, 662–676.

Müller, S., Schubert, A., Zajac, J.& Dyck, T. (2015). Oelkrug, C. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*, 20, 14:109.

Najdi, S., Nikbakht Brujeni, G., Sheikhi, N. & Chakhkar, S. (2016). Development of anti-Helicobacter pylori immunoglobulins Y (IgYs) in quail. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 17(2):106-110.

Narat, M. (2003). Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*; 41, 259 – 67

Nilsson, E., Hanrieder, J., Bergquist, J. & Larsson, A. (2008). Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:11638 - 11642;

Rahman, S., Van Nguyen, S., Icatlo, F. C., Umeda, K., Kodama, Y. (2013). Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5):1039-48.

Réhault-Godbert, S., Guyot, N. & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*. 22;11(3):684.

Russo, M., Nahori, M. A., Lefort, J., Gomes, E., de Castro Keller, A., Rodriguez, D. (2001). Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24:518 - 26;

Schade, R., Gutierrez Calzado, E. J., Sarmiento, R., Chacana, P., Porankiewicz-Asplund, J., Horacio Raúl, T. (2005). Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *Alternatives to laboratory animals*, 33, 129-54.

Stålberg, J. & Larsson, A. (2001). Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Upsala Journal of Medical Sciences*, (2):99-110.

Sutton, P., & Lee, A. (2011). Helicobacter pylori vaccines-the current status. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14, 1107–1118.

Taylor, A. I., Gould, H. J., Sutton, B. J. & Calvert, R. A. (2008). Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 16384 – 90.

Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li, S. (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnology Advances*, 29:860 – 868.

Yamane, T., Saito, Y., Takizawa, S., Goshima, H., Kodama, Y., Horie, N. & Kim, M. (2003). Development of Anti-Helicobacter pylori Urease IgY and Its Application for Food Product. *Food Processing and Ingredients*, 38, 70-78.

Yong, X., Tang, B., Li, B. S., Xie, R., Hu, C. J., Luo, G., Yang, S. M. (2015). *Helocobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Communication and Signaling*, 30, 13-20.

Lee, N. H., Ryu, J. S., Jung, K. Y., Baek, B. S., Sunwoo, S. Y. (2003). Method for the production of the egg containing anti-pathogenic bacteria specific antbodies(igy) and the yogurt and ice cream containing the igy US20030185856A1.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 133- 142

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۱۴۲-۱۳۳

Production of Beneficial Ice Cream Containing Immunoglobulin Y against *Helicobacter pylori*

S. Sabahi[1], S. A. Mortazavi*[2], M. R. Nassiri[3], K. Ghazvini[4], F. Shahidi[3]

Received: 2019.04.22
Accepted: 2019.10.06

Introduction: Immunoglobin Y (IgY) or egg yolk antibodies have captured attention as substitutes for antibiotics against the presence of disease-causing organisms (Thomsen *et al*., 2016; Li *et al*., 2015; Pereira *et al*., 2019). Compared to mammalian IgG, IgY has several advantages including high yield, cost-effectiveness, and convenience (Li *et al*., 2015). It has been reported that the use of IgY against *Helicobacter pylori* can be particularly useful for prevention and treatment of diseases (Najdi *et al*., 2016). The growth inhibitory effect of IgY antibody is one of its crucial features (Alfarouk *et al*., 2019), meaning that IgY antibody could be consumed daily with no health risks. Therefore, daily consumption of IgY requires a suitable host. The ice cream is the best choice for this proposed, because this product is maintained at -18 C and ice cream composition has positive effect on the function of IgY. Therefore, we develop a new product for the prevention and treatment of *Helicobacter pylori.*

Material and Methods: The Mueller-Hinton media was used for *H. pylori* growth. Then, 10^9 colonies of bacterium were inactivated by formaldehyde methods. The 3 white leghorn chickens (Animal Science Department of Ferdowsi University of Mashhad) of 16 weeks old were immunized by *H. pylori* and Freund's complete adjuvant with an equal volume. The reminder immunization was done two weeks later and using of Freund's incomplete adjuvant for stage 2. One week after the chickens received their last injection, their eggs were collected on a daily basis for eight weeks, labeled and kept at 4 °C (Pauly *et al*., 2011). Extraction and purification of IgY antibody from egg yolk was done using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) powder (Merck, Germany) according to Polson's method (Pauly *et al*., 2011). The IgY production wasverified by the SDS-PAGE and Bradford methods. The specific activity of IgY antibody against *H. pylori* was examined by ELISA. The absorbance of each well was measured at 492 nm (Nasiri *et al*., 2016). The egg yolk ice cream preparation contains IgY was prepared according to the method of Herald *et al* (2008). For estimation of IgY shelf life in ice cream, the residual activity of IgY after freezing was measured by ELISA. The Sensory evaluation of the egg yolk ice creams was conducted by 5-point hedonic scale through surveys to assess consumers' level of acceptance.

Results and Discussion: The purification of IgY using the SDS-PAGE method was verified correctly and the size of heavy and light chains of IgY was estimated about 65 and 27 kDa. The IgY yield in samples was 11.46 mg/ml, therefore, the high purity and yield of IgY, it could be effectively used as an ideal antibody in the food industry. The purification of IgY from egg yolk by PEG method is remarkably cost effective. The ELISA assay indicated binding of IgY to *H. pylori* antigen that was fixed on plates. Also, the results revealed significant differences between the control and treatment groups (P-value <0.001). The shelf life of IgY in ice cream showed that this product could be most certainly used as bio-food. ELISA analysis confirmed that IgY could remain effective in ice cream for 3 months. The activity of IgY during this period decreased about 6%, which is insignificant. The sensory features of ice cream using hedonic scale revealed that this product could be suitable for marketing, as no significant difference was found between egg yolk and vanilla ice creams. Ice cream is considered as the best candidate for production of IgY bio-foods, as it possesses the features needed to protect IgY and to increase efficiency of IgY activity. The optimum temperature for protection of ice cream was -18 °C that is utterly suitable for IgY protection. Furthermore, ice cream is consumed while cold and studies showed that IgY can remain active at temperatures of up to 80 °C and pasteurization process had no effect on IgY activity (Horie *et al*., 2004). Jaradat *et al* (2000) reported that, IgY activity was inhibited in presence of carbohydrates (sucrose, lactose and trehalose). Therefore, here, we used freeze dried egg yolk to protect IgY.

1. PhD Candidate, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: morteza@um.ac.ir.
3. Professor, Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical science, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: Morteza1937@yahoo.com)

Consequently, ice-cream is an ideal candidate for transferring antibodies into human body, as the particular composition of ice cream can properly protect IgY antibodies.

Keywords: Immunoglobin Y, Ice Cream, *H. pylori*, Inactive Immune System.